

Über die Blockierung von Hefe-Coenzym A
und seiner Neubildung
durch Janusgrün B und Kaliumcyanid

von
Hermann Ammon
aus Fürth/Bay.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. F. Heim

Über die Blockierung von Hefe-Coenzym A und seiner Neubildung

durch Janusgrün B und Kaliumcyanid

Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu

Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von

Hermann A m m o n

aus

Fürth/Bay.

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. A. Windorfer

Referent: Prof. Dr. F. Heim

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Dezember 1962

Für die freundliche Überlassung des Themas
und die gewährte Unterstützung bei der
Ausführung dieser Arbeit möchte ich Herrn
Prof. Dr. F. Heim meinen besten Dank sagen.

HAAS
UNIVERSITÄT
HEIM

Über die Blockierung von Hefe-Coenzym A und seiner Neubildung durch Janusgrün B und Kaliumcyanid

Nach Estler, Heim, Moosburger und Herzog führen thiolgruppenblockierende Stoffe (Salyrgan, Oxarsan, Spirotrypan, Neosalvarsan, Sublimat, Natriumarsenit) sowie Janusgrün B und Kaliumcyanid zur Abnahme des Coenzym A-Gehaltes von Hefezellen. Zur Klärung der Frage, ob und inwieweit diese Abnahme auf einer direkten Blockierung des Coenzym A selbst bzw. auf einer Hemmung der Coenzym A-Synthese durch Inaktivierung der am Coenzym A-Aufbau beteiligten Enzyme beruht, wurden weitere Versuche durchgeführt. Daneben wurden Versuche angestellt, die die Einwirkung von Janusgrün B, Kaliumcyanid und Sublimat auf die von Lynen modifizierte Coenzym A-Bestimmungsmethode nach Kaplan und Lipmann untersuchen sollen.

Methodik

Zu den Versuchen wurde Bäckerhefe der Firma Bast in Nürnberg-Buch verwendet. Die Coenzym A-Bestimmung erfolgte nach der von Lynen modifizierten Methode von Kaplan und Lipmann, die auf der Acetylierung von Sulfanilamid durch Coenzym A und der anschließenden kolorimetrischen Bestimmung des nicht acetylierten Sulfanilamids beruht. Aus den Extinktionswerten wird anhand einer Eichkurve, die mit einem 75% reines Coenzym A enthaltenden Präparat hergestellt wurde, der Coenzym A-Gehalt in g/g Trockenhefe errechnet. Der für die von uns verwendete Hefe ermittelte Umrechnungsfaktor Frischhefe/Trockenhefe beträgt 0,2. Die Zahl der Versuche, aus denen jeder der in den Abbildungen angegebenen Mittelwerte gewonnen wurde, liegt zwischen 9 und 12. Bei der

Bestimmung des Coenzym A-Gehaltes wurde im einzelnen wie folgt verfahren:

In Kunststoffzentrifugenbecher werden folgende Lösungen pipettiert:

0,02 ml einer frischbereiteten m-NaHCO₃-Lösung

0,04 ml 0,11 m Glutathion (reduziert)

0,067 ml Reaktionsgemisch: (6 ml 0,06 m ATP, 6 ml 0,2 m Natr. citric., 0,75 ml m Natr. acetic.)

0,033 ml 0,006 m Sulfanilamid

0,1 ml der auf Coenzym A zu untersuchenden Flüssigkeit (Hefekochsaft)

0,06 ml gealtertes Taubenleberferment

Die Becher werden mit Gummistopfen verschlossen und 2 Stunden bei 37° C im Wasserbad incubiert. Im Anschluß daran wird in jeden Becher 1 ml einer 5-prozentigen Trichloressigsäure gegeben. Der entstandene Niederschlag wird 5 Minuten bei 10 000 U/min abzentrifugiert und der Überstand in bereitgestellte, nummerierte Reagenzgläser gegossen. Aus jedem dieser Gläser werden 0,6 ml in eine neu nummerierte Reagenzglasreihe, die bereits 5 ml Aqua dest. enthält, pipettiert. Anschließend werden die Reagenzgläser 5 bis 7 Minuten in ein Eisbad gestellt. Danach werden in jedes Reagenzglas im Abstand von 15 Sekunden (Stoppuhr) 0,6 ml 0,1-prozentige NaNO₂-Lösung, exakt 3 Minuten später wieder im Abstand von 15 Sekunden 0,6 ml 0,5-prozentige Ammoniumsulfaminatlösung und genau 2 Minuten später 0,6 ml 0,1-prozentige Naphthylaethyldiaminlösung zugefügt. Es bildet sich dabei eine rosarote Färbung, deren Intensität nach 20 Minuten im Zeiss-Elko III-Kolorimeter in einer Schichtdicke von 2 cm bei einer Wellenlänge von 545 m μ gegen Aqua dest. abgelesen wird.

Aufstellung der Eichkurve:

Es wurde dazu eine wässrige Lösung von Coenzym A verwendet, die 50% 75-prozentiges Coenzym A im ml enthält. In aufsteigender Reihe werden zwischen 0,45 und 2,7% Coenzym A zu den Testansätzen gegeben. Die erhaltenen Extinktionswerte werden als Kurve aufgetragen und anhand dieser Kurve die unbekannten Coenzym A-Werte aus den Hefekochsäften abgelesen. Das Taubenleberferment, das das für den Test wichtige Fermentsystem enthält, wurde nach Angaben von Lynen und Mitarb. hergestellt.

Bereitung der Hefekochsäfte:

Von der zu untersuchenden Hefesuspension wurden 10 ml in einen Metallzentrifugenbecher pipettiert und 2 Minuten bei 5 000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und verworfen. Zur Entfernung der Giftstoffe (Janusgrün B, Kaliumcyanid, Sublimat) wurden die Hefezellen gewaschen, indem der vorher gewonnene Bodensatz mit 10 ml Aqua dest. versetzt, aufgerührt, wieder abzentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Nun wurde nochmals auf die gleiche Weise mit 5 ml Aqua dest. gewaschen. Zum Aufschluß der Hefezellen wurde der Bodensatz im Metallbecher mit 1,33 ml siedendem Aqua dest. übergossen, unter Umrühren einmal über der Bunsenflamme aufgeköcht und sofort in ein Eisbad gegeben. Die Hefezelltrümmer wurden 10 Minuten bei 15 000 U/min abzentrifugiert und der Überstand zur Untersuchung gebracht.

Versuchsanordnung

Die Versuche gehen davon aus, daß in einer an Coenzym A verarmten Hefe der Coenzym A-Gehalt nach Zusatz eines Atmungssubstrates, in diesem Falle Natriumacetat, wieder ansteigt, also eine Neubildung von Coenzym A einsetzt. Da die Hefe zu diesem

Zweck erst an Coenzym A verarmt werden mußte, wurde frische Bäckerhefe 5-prozentig in Leitungswasser suspendiert und 24 Stunden unter Durchperlen mit Sauerstoff bei 30° C im Thermostat geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren wurde die Hefe 10-prozentig in m/30 KH_2PO_4 suspendiert. In einen Kolben wurden sodann 2 Teile der 10-prozentigen Hefesuspension und ein Teil m/30 KH_2PO_4 -Lösung gegeben und das Ganze 15 Minuten bei 30° C geschüttelt. Daraufhin wurde ein Teil 0,07 m Natriumacetat in m/30 KH_2PO_4 -Lösung (als Atmungssubstrat) zugesetzt. Die Hefezellsuspension ist also jetzt 5-prozentig. In diesem Moment fängt die Coenzym A-Neubildung an. Gleichzeitig wurden die Gifte zugesetzt. Die Kontrollen blieben ohne Giftzusatz. Zur Bestimmung der Direkthemmung wurde nach 5 Minuten eine Probe entnommen und der Kochsaft bereitet. Zur Bestimmung der Coenzym A-Neubildung bzw. deren Hemmung wurden die Ansätze mit den Giften bzw. die Kontrollen ohne Giftzusatz bei 30° C im Thermostat geschüttelt und aus ihnen nach 30, 60, 120 und 180 Minuten je eine Probe entnommen, der Kochsaft bereitet und die Coenzym A-Aktivität bestimmt. Die Direkthemmung in den Giftansätzen ergibt sich aus der Abnahme der Coenzym A-Aktivität 5 Minuten nach Zugabe der Gifte. Die Hemmung der Coenzym A-Neubildung ergibt sich aus den Unterschieden des Coenzym A-Gehaltes der Kontrollen gegenüber dem der Giftansätze nach 30, 60, 120 und 180 Minuten.

Kritische Betrachtung der Methodik

Zur Frage, ob es sich bei der Hemmung des Coenzym A durch Janusgrün B, Kaliumcyanid und Sublimat tatsächlich um eine Inaktivierung des Coenzym A oder um eine Störung des Testansatzes durch kleine Mengen des Giftes, die beim Auswaschen der Hefe-

zellen nicht zu beseitigen waren und daher in den Testansatz gelangen, handelt, wurden folgende Versuche angestellt. Den Testansätzen, welche die zu untersuchenden Kochsäfte aus den Hefezellsuspensionen 5 Minuten nach Zusatz von $1,95\mu$ Mol/l Janusgrün B, $76,9\mu$ Mol/l Kaliumcyanid und $1,1\mu$ Mol/l Sublimat enthielten, wurden je $0,9\mu$ reines Coenzym A zugesetzt. Ist der Test gehemmt, so darf das zugesetzte reine Coenzym A nachher nicht mehr oder nur noch zu einem Teil erscheinen. Beim Janusgrün B und Kaliumcyanid erscheint das zugesetzte Coenzym A dann auch quantitativ wieder in der Summe aus dem noch vorhandenen Coenzym A des Hefekochsaftes und dem zugesetzten Coenzym A. Der Test wird also durch evtl. Verunreinigungen der Hefekochsäfte mit diesen beiden Giften nicht gestört. Beim Sublimat ist dies jedoch anders. Hier erscheint von der Summe aus dem Coenzym A des Hefekochsaftes und dem zugesetzten Coenzym A prozentual etwa soviel wie aus dem Hefekochsaft ohne Zugabe von reinem Coenzym A; d. h., daß der Test zu einem bestimmten Prozentsatz durch verunreinigendes Hg gehemmt wird. Um ein klares Bild über den Hemmungsmechanismus des Testes durch Sublimat zu gewinnen, wurden weitere Versuche durchgeführt. Auf Filtrierpapier wurde Hefekochsaft aus der Kontrolle und aus den Proben mit $0,184$ und $1,1\mu$ Mol/l HgCl_2 aufgetragen, trocknen lassen und mit Dithizon-Reagenz (nach Merck) besprüht. Die Proben aus den Giftansätzen geben die für Hg-Ionen charakteristische rötliche Färbung mit einer der Konzentration der Gifte entsprechenden Abstufung. Damit ist bewiesen, daß im Kochsaft trotz vorherigem Auswaschen der Hefezellen noch Hg-Ionen vorhanden sind.

Die Affinität der Hg-Ionen zu SH-haltigen Verbindungen ist bekannt. Im Testansatz befinden sich $0,04$ ml einer $0,11$ m Glutathionlösung, d. i. ein mehr als tausendfacher Überschuß an

SH-haltiger Verbindung gegenüber den Mengen an Hg-Ionen, die theoretisch in den Testansatz gelangen können. Die Hg-Ionen dürften daher quantitativ in ein Merkaptid mit dem Glutathion übergeführt werden. Dies zeigt auch das Experiment. Prüft man den Coenzym A-Testansatz, der neben dem Hefekochsaft nach Sublimat das Glutathion enthält, mit Dithizon-Lösung, so erhält man keine Farbreaktion mehr, die das Vorhandensein von Hg-Ionen anzeigen würde.

Während der fünfminütigen Einwirkung von HgCl_2 auf die Hefezellen kommt es in diesen zur Bildung von Merkaptiden des Coenzym A, Glutathion und anderer SH-haltiger Verbindungen. Daneben sind auch noch Quecksilberionen vorhanden, die sich trotz zweimaligem Auswaschen von je 5 Minuten Dauer mit der 20-fachen und der 10-fachen Menge Wasser nicht quantitativ entfernen lassen. Sie können, wie oben gezeigt wurde, im Hefekochsaft nachgewiesen werden. Im Testansatz selbst befinden sie sich nicht mehr, da sie vorher mit dem Überschuß an Glutathion ein Merkaptid gebildet haben. Trotzdem wird aber der Test gehemmt. Das spricht dafür, daß das Hg des Merkaptids mit dem Glutathion im Test in der Lage ist, auf das für die Transacetylierung wichtige Fermentsystem des Taubenleberferments überzugehen und es für die Übertragung von Acetylgruppen vom Acetyl-Coenzym A auf das Sulfanilamid unbrauchbar zu machen.

Über das Ausmaß der Testhemmung durch Zugabe von HgCl_2 zum Testansatz sollen folgende Versuche etwas aussagen.

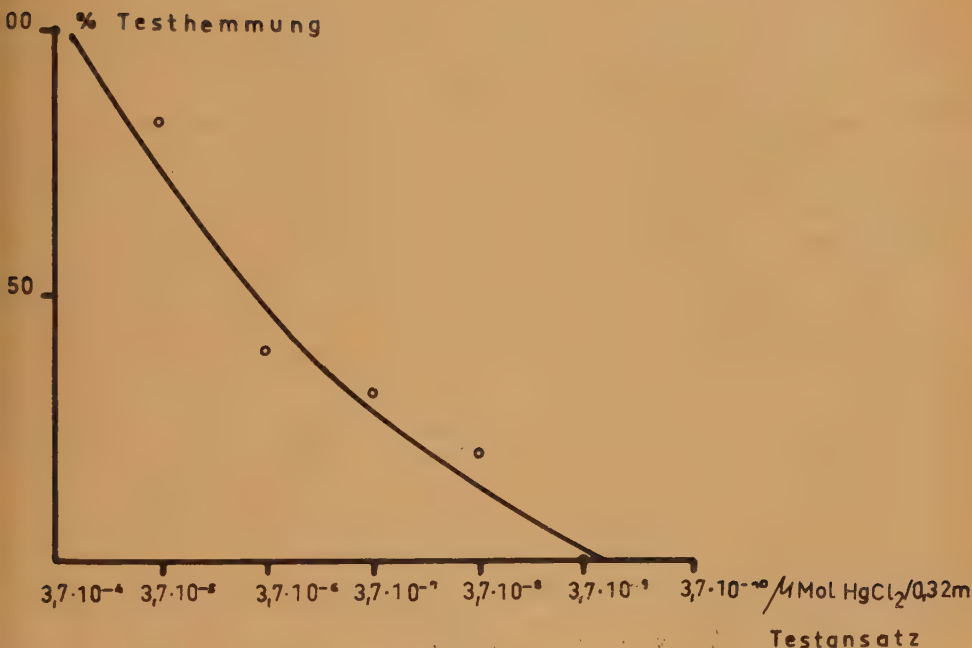


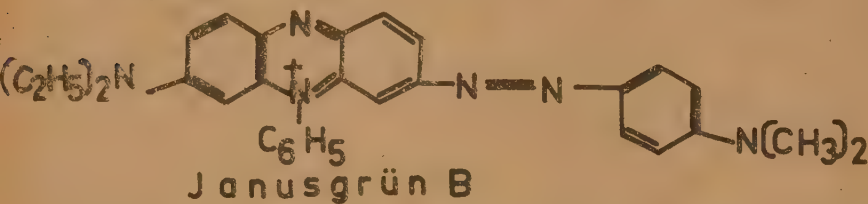
Abbildung 1.

In die Testansätze wurde 1,35 γ reines Coenzym A gegeben, dazu in absteigender Reihe HgCl_2 zwischen $3,7 \cdot 10^{-4}$ und $3,7 \cdot 10^{-10}$ $\mu\text{Mol}/0,32\text{ ml}$ Testansatz.

Bei Zusatz von $3,7 \cdot 10^{-4} \mu\text{Mol HgCl}_2$ ist der Test vollkommen gehemmt. Bei $3,7 \cdot 10^{-5} \mu\text{Mol}$ beträgt die Testhemmung 83%, bei $3,7 \cdot 10^{-6} \mu\text{Mol}$ 40%, bei $3,7 \cdot 10^{-7} \mu\text{Mol}$ 32% und bei $3,7 \cdot 10^{-8} \mu\text{Mol}$ 21%. Bei $3,7 \cdot 10^{-9} \mu\text{Mol}$ ist eine Testhemmung nicht mehr festzustellen.

Für unsere vorgesehenen Versuche zur Direkthemmung von Coenzym A durch $0,184 \mu\text{Mol/l}$ und $1,1 \mu\text{Mol/l}$ ergibt sich daraus, daß die Hg -Mengen, die in den Test theoretisch gelangen können, diesen zwischen 20 und 80% zu hemmen vermögen. Aus diesem Grunde können Versuche, die die Direkthemmung und Bildungshemmung von Coenzym A durch Sublimat untersuchen sollten, nicht durchgeführt werden.

Direkthemmung und Hemmung der Neubildung von Coenzym A durch Janusgrün B, einer Azoverbindung aus Diaethylsafranin und Dimethylaminoanilin (Mol.-Gew. 511)



Janusgrün B gehört mit zu den wirksamsten Coenzym A-inaktivierenden Stoffen.

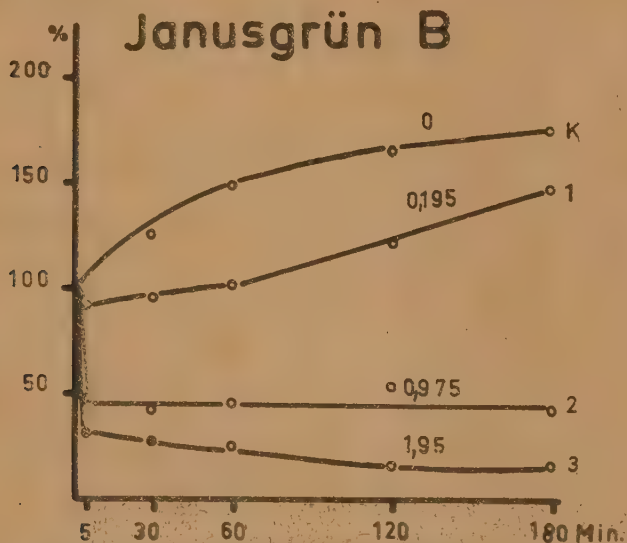


Abb. 2. Direkthemmung und Hemmung der Coenzym A-Neubildung in Hefezellen durch Janusgrün B. Die Ausgangskonzentration an Coenzym A beträgt 257 μ /g (= 100%) Trockenhefe.

Kurve K: Kontrolle

Kurve 1: 0,195 μ Mol/l Janusgrün B

Kurve 2: 0,975 μ Mol/l Janusgrün B

Kurve 3: 1,95 μ Mol/l Janusgrün B

Bei einer Hemmstoffkonzentration von 0,195 μ Mol/l Janusgrün B in der Hefezellsuspension sinkt die Coenzym A-Aktivität nach 5 Minuten Einwirkungsdauer um 8% (Direkthemmung).

Der Coenzym A-Gehalt in der Kontrolle nimmt nach 30, 60, 120 und 180 Minuten um 31, 46, 58 und 72% zu, der Coenzym A-Gehalt im Giftansatz um 5, 11, 34 und 61%.

Die Coenzym A-Neubildung unter $0,195 \mu\text{Mol/l}$ ist nach 30 Minuten zu 87%, nach 60 Minuten zu 81% gehemmt. Nach 120 und 180 Minuten ist die Zunahme des Coenzym A-Gehaltes im Giftansatz größer als die in der Kontrolle. Die Neubildung ist zu diesem Zeitpunkt im Giftansatz offenbar nicht mehr gehemmt. Bei einer Hemmstoffkonzentration von $0,975 \mu\text{Mol/l}$ Hefesuspension sinkt die Coenzym A-Aktivität durch Direkthemmung nach 5 Minuten um 52%. Sie verändert sich im Laufe von 3 Stunden nicht. Eine Coenzym A-Neubildung ist also nicht mehr festzustellen. Bei der Janusgrün B-Dosis von $1,95 \mu\text{Mol/l}$ Hefesuspension beträgt die Direkthemmung nach 5 Minuten 69%. Die Coenzym A-Aktivität sinkt in den folgenden 180 Minuten bis auf 17%. Eine Coenzym A-Neubildung ist nicht mehr vorhanden.

Die angestellten Versuche haben ergeben, daß die unter dreistündiger Einwirkung von Janusgrün B auf Hefezellen beobachtete Abnahme der Coenzym A-Aktivität ihre Ursachen erstens in der sofort eintretenden Inaktivierung eines Teiles des vorhandenen Coenzym A und zweitens in einer anschließenden Hemmung der Coenzym A-Neubildung haben kann, die sehr wahrscheinlich auf einer Inaktivierung der am Aufbau des Coenzym A beteiligten Fermente beruht.

Direkthemmung:

Durch Janusgrün B, einem Redoxfarbstoff, erfolgt eine Direkthemmung, und zwar durch $0,195 \mu\text{Mol/l}$ um 8%, $0,975 \mu\text{Mol/l}$ um 52% und $1,95 \mu\text{Mol/l}$ um 69%. Es wird dabei wahrscheinlich die Sulfhydrylform des Coenzym A blockiert. Dabei muß es sich um einen

über die Oxydation zum Disulfid hinausgehenden Inaktivierungsprozeß handeln, da eine Reaktivierung nach Zugabe eines Überschusses an Glutathion nicht eintritt. Die in den folgenden 3 Stunden in Gegenwart von $1,95 \mu \text{ Mol/l}$ Janusgrün B über die Direkthemmung hinausgehende Abnahme der Coenzym A-Aktivität dürfte im Sinne einer Gleichgewichtsreaktion zu erklären sein, bei der das kontinuierlich aus der Acylform bzw. Disulfidform entstehende Sulfhydryl-Coenzym A sofort wieder durch Janusgrün B inaktiviert wird.

Hemmung der Coenzym A-Neubildung:

Die Hemmung der Coenzym A-Neubildung durch $0,195 \mu \text{ Mol/l}$ Janusgrün B in der ersten Stunde und die Beschleunigung der Coenzym A-Zunahme in den folgenden 2 Stunden deuten daraufhin, daß ein von uns nach 60 Minuten im Ansatz beobachteter Farbumschlag offenbar mit einer chemischen Umwandlung des Janusgrün B einhergeht, die zu einer Änderung in dessen enzymhemmenden Eigenschaften führt. Da eine vollständige Hemmung der Coenzym A-Neubildung schon durch Janusgrün B-Konzentrationen erfolgt, die eine Direkthemmung zwischen 52 und 69% bewirken, erweisen sich bestimmte, für den Aufbau des Coenzym A notwendige Enzyme gegenüber diesen Stoffen empfindlicher als das Coenzym A-Molekül selbst. Die Janusgrün B-Konzentration von $0,975 \mu \text{ Mol/l}$, die die Coenzym A-Neubildung vollständig blockiert, ist nach Estler, Heim, Herzog und Moosburger ohne Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch von Hefezellen. Doch bewirkt Janusgrün B nach den Befunden von Judah und Williams-Aschman; Case und Mc. Ilwain, sowie Diansani und Scuro eine Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung. Deshalb dürfte die Hemmung der Coenzym A-Neubildung durch Janusgrün B im Zusammenhang mit der ungenügenden Bildung energiereicher

Phosphatester besonders von ATP stehen. Schon zur Synthese von 1 Mol Coenzym A aus Pantothersäure werden 4 Mol ATP benötigt.

Direkthemmung und Hemmung der Neubildung von Coenzym A durch Kaliumcyanid

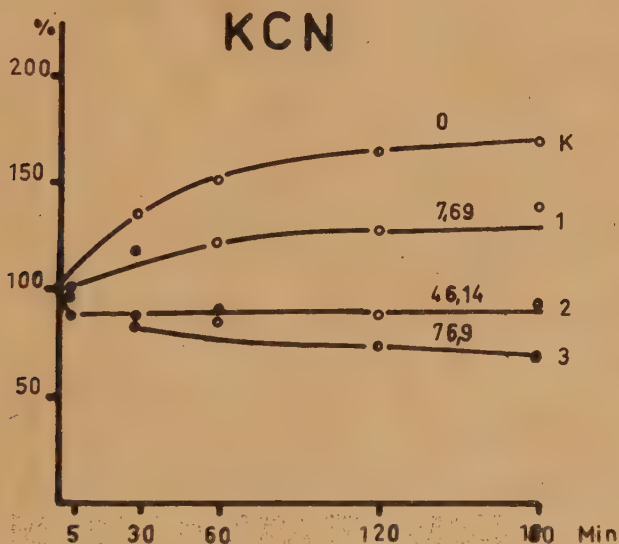


Abb. 3. Direkthemmung und Hemmung der Coenzym A-Neubildung in Hefezellen durch Kaliumcyanid. Die Ausgangskonzentration beträgt 242 γ /g (= 100%) Trockenhefe.

Kurve K: Kontrolle

Kurve 1: 7,69 μ Mol/l KCN

Kurve 2: 46,14 μ Mol/l KCN

Kurve 3: 76,9 μ Mol/l KCN

Bei einer Hemmstoffkonzentration von 7,69 μ Mol/l Kaliumcyanid kommt es nach 5 Minuten zu keiner Direkthemmung.

Nach 30, 60 und 120 Minuten nimmt der Coenzym A-Gehalt in der Kontrolle um 38, 49, 66% zu, der in dem Giftansatz um 17, 21 und 27%. Die Coenzym A-Neubildung ist unter 7,69 μ Mol/l nach

30 Minuten zu 54%, nach 60 Minuten zu 57% und nach 120 Minuten zu 59% gehemmt. Unter $1,54\mu\text{ Mol/l}$ liegt ebenfalls keine Direkthemmung vor. Die Bildungshemmung ist nur um einige Prozent geringer als unter $7,69\mu\text{ Mol/l}$, so daß auf die Darstellung in der Abbildung verzichtet wurde. Bei Zusatz von $46,14\mu\text{ Mol/l}$ wird nach 5 Minuten eine Direkthemmung von 13% erreicht. Im Verlauf von 3 Stunden findet eine Coenzym A-Neubildung nicht mehr statt. Bei einer Erhöhung des Kaliumcyanidzusatzes auf $76,9\mu\text{ Mol/l}$ steigt die Direkthemmung nicht an. Nach 120 Minuten sinkt die Coenzym A-Aktivität um 26% und nach 180 Minuten um 31% des Ausgangswertes der Kontrolle.

Die angestellten Versuche zeigen, daß die unter 3-stündiger Einwirkung von Kaliumcyanid auf Hefezellen beobachtete Abnahme der Coenzym A-Aktivität ihre Ursachen in der sofort eintretenden Inaktivierung eines Teiles des vorhandenen Coenzym A und zweitens in einer anschließenden Hemmung der Coenzym A-Neubildung haben kann, die sehr wahrscheinlich auf einer Inaktivierung der am Aufbau des Coenzym A beteiligten Fermente beruht.

Direkthemmung:

Die geringe Direkthemmung durch Kaliumcyanid bei $46,14\mu\text{ Mol/l}$ zu 13% nach 5 Minuten beruht wahrscheinlich auf einer Spaltung des Coenzym A-Disulfids mit gleichzeitiger Inaktivierung eines Teiles des Coenzym A als Thiocysansäureester wie durch weitere Versuche noch gezeigt werden soll. Daß die Hemmung bei einer Giftkonzentration von $76,9\mu\text{ Mol/l}$ auf 31% nach 180 Minuten zunimmt, könnte dadurch erklärt werden, daß die Disulfidspaltung durch Kaliumcyanid nicht nur von der Konzentration des Giftes, sondern auch von seiner Einwirkungsdauer abhängig ist und somit im Laufe der Zeit eine weitere Spaltung des Disulfids eintritt.

Hemmung der Coenzym A-Neubildung:

Da eine vollständige Hemmung der Coenzym A-Neubildung schon durch eine Kaliumcyanidkonzentration erfolgt, deren Direkthemmung nur 13% beträgt, erweisen sich die für den Aufbau des Coenzym A notwendigen Enzyme gegenüber diesem Stoff viel empfindlicher als das Coenzym A-Molekül selbst. Kaliumcyanidkonzentrationen, die die Coenzym A-Neubildung aufheben, senken nach Estler, Heim, Moosburger und Herzog die Atmung von Hefezellen um 90% und mehr. Vom Kaliumcyanid ist bekannt, daß es schon in sehr geringen Mengen mit dem Fermenteisen der Cytochromoxydase reagiert und so in den Oxydationsstoffwechsel eingreift. Die Hemmung bzw. Aufhebung der Coenzym A-Neubildung ist daher als eine Folge der Schädigung des Oxydationsstoffwechsels der Hefezellen zu betrachten.

Es folgen nun Versuche, die die Frage klären sollen, ob die bei der Hemmung von Hefecoenzym A durch Kaliumcyanid beobachtete Direkthemmung auf einer Spaltung von Coenzym A-Disulfid beruht, bei der dann ein Teil des Coenzym A in einen Thiocyan säureester überführt wird, der keine Coenzym A-Aktivität besitzt, n. d. Gl.



Es wurde eine Lösung verwendet, die 50 γ 75-prozentiges Coenzym A im ml enthält. Das reine Coenzym A in der verwendeten Lösung enthält zu einem nicht bekannten Teil das Coenzym A in der Disulfidform. 1,5 ml der Coenzym A-Lösung wurden 30 Minuten lang mit 3 mg Kaliumcyanid versetzt. Daraufhin wurde mit dieser so vorbehandelten Lösung eine Eichkurve aufgestellt, wie sie im methodischen Teil angegeben ist. Es zeigte sich, daß man bei

dieser Eichkurve 20 bis 30% weniger Coenzym A findet als bei der normalen Eichkurve. Im zweiten Versuch wurden zu 1,5 ml Coenzym A-Lösung 100 γ Glutathion zur Reduktion des Coenzym A-Disulfids zugegeben, das Ganze 30 Minuten stehen gelassen, darauf wieder 3 mg Kaliumcyanid zugesetzt und nochmals 30 Minuten stehen gelassen. Dann wurde auch mit dieser Lösung die Eichkurve aufgestellt, die sich von der Normaleichkurve diesmal nicht unterscheidet. Diese Versuche sprechen für die Annahme, daß ein Coenzym A, welches Disulfid enthält, bei Zusatz von Kaliumcyanid einen Teil seiner Aktivität verliert. Wenn man aber vorher das vorhandene Disulfid durch Glutathion reduziert, so tritt nach Zusatz derselben Menge Kaliumcyanid kein Aktivitätsverlust auf, weil das Kaliumcyanid mit der SH-Form des Coenzym A keinen inaktiven Thiocyan säureester bildet. Der Aktivitätsverlust des Coenzym A beruht also sehr wahrscheinlich auf der in obiger Gleichung angegebenen Spaltung des Disulfids durch Kaliumcyanid mit gleichzeitiger Bindung eines Teils des Coenzym A als Thiocyan säureester, der für die Übertragung von Acetylgruppen auf das Sulfanilamid nicht mehr infragekommt.

Zusammenfassung

Mit Hilfe des von Kaplan und Lipmann angegebenen und von Lynen und Mitarb. modifizierten Verfahrens, das auf der Acetylierung von Sulfanilamid durch Coenzym A beruht, wurde der Coenzym A-Gehalt von Hefezellen und der Einfluß von Janusgrün B und Kaliumcyanid auf das Coenzym A von Hefezellen bestimmt.

Janusgrün B ist eine Redoxsubstanz, die mit zu den wirksamsten Coenzym A-inaktivierenden Stoffen gehört. Die Abnahme des Coenzym A in Hefezellen in Gegenwart von mehreren Janusgrün B-Konzen-

trationen beruht erstens auf einer Direkthemmung des Coenzym A und zweitens auf einer Hemmung der Coenzym A-Neubildung, die wahrscheinlich als eine Inaktivierung der an der Coenzym A-Neubildung beteiligten Enzyme erfolgt. Doch besteht die Möglichkeit, daß durch Janusgrün B eine Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung bewirkt wird. Deshalb dürfte die Hemmung der Coenzym A-Neubildung durch Janusgrün B im Zusammenhang mit der ungenügenden Bildung von ATP stehen. Die Größe der Direkthemmung und der Hemmung der Coenzym A-Neubildung durch Janusgrün B ist von der Konzentration des Giftstoffes abhängig.

Die Direkthemmung des Coenzym A durch Kaliumcyanid ist nur in geringem Umfange konzentrationsabhängig. Sie dürfte, wie unsere Versuche ergeben haben, auf einer Spaltung des Coenzym A-Disulfids in die Sulfhydrylform mit gleichzeitiger Umwandlung eines Teiles des Coenzym A in den inaktiven Thiocyansäureester des Coenzym A beruhen. Die Hemmung der Coenzym A-Neubildung durch Kaliumcyanid beruht vermutlich auf der Blockierung der Cytochromoxydase und damit des Oxydationsstoffwechsels, da die zur Blockierung der Coenzym A-Neubildung notwendigen Kaliumcyanidkonzentrationen die Atmung der Hefezellen zu 90% hemmen.

Es wurde auch versucht, den Einfluß des Sublimats auf die Coenzym A-Aktivität und -Neubildung aufzuklären. Doch haben unsere Versuche ergeben, daß trotz mehrfachen Auswaschens der Hefezellen Hg-Ionen mit in den Testansatz gelangen. Trotz Bildung eines Mercaptids durch den über tausendfachen Überschuß an Glutathion wurde das acylierende Fermentsystem der Taubenleber, das die Übertragung der Acetylgruppe vom Acetyl-Coenzym A auf das Sulfanilamid besorgt, geschädigt, auch wenn keine Hg-Ionen im Ansatz mehr nachzuweisen sind. Somit müssen die Ergebnisse früherer Untersuchungen, bei denen der Einfluß des Sublimats auf Coenzym A mit Hilfe der oben angegebenen Methodik untersucht wurde, in Zweifel gezogen werden.

Literatur

Case, E.M. and H. McIlwain: Biochem.J. 48, 1 (1951)

Decker, K.: Die aktivierte Essigsäure, Enke-Verlag Stuttgart 1959

Dianzani, M.K. and H. Scuro: Biochem.J. 62, 205 (1956)

Estler, C.-J., F. Heim, A. Moosburger u. U. Herzog: Naunyn-

Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol., 238, 301 (1960)

Judah, J.D. and H.G. Williams-Ashman: Biochem.J. 44, 11 (1949)

Kaplan, N.O. and F. Lipmann: J.biol.Chemistry 174, 37 (1948)

Lynen, F., E. Reichert u. L. Rueff: Liebigs Ann. 574, 1 (1951)

Lebenslauf

Am 24.1.1933 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Theodor Ammon und seiner Ehefrau Käthe Ammon geb. Schatz in Nürnberg geboren. Von 1939 bis 1943 besuchte ich die Volksschule in Fürth, anschließend die dortige Oberrealschule, wo ich 1952 die Reifeprüfung mit Erfolg ablegte. Von Oktober 1952 bis September 1954 arbeitete ich in der Fichtenapotheke in Fürth als Apotheker-Praktikant. Im WS 1954/55 begann ich in Erlangen mit dem Studium der Pharmazie. Ab SS 1955 begann ich zusätzlich mit dem Studium der Medizin. Im März 1958 legte ich die pharmazeutische Staatsprüfung, im Mai 1959 das Physikum und im August 1962 das medizinische Staatsexamen in Erlangen mit Erfolg ab. Seit 1.9.1962 bin ich als Medizinalassistent im Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen tätig.

GEDRUCKT BEI LUDWIG MÜLLER ERLANGEN